

Best Available Copy

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 juillet 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/051415 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/47, 31/4745, A61P 25/00, 43/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB01/02572

(22) Date de dépôt international :
17 décembre 2001 (17.12.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/15571 22 décembre 2000 (22.12.2000) FR

(71) Déposants et

(72) Inventeurs : XILINAS, Michel [FR/CY]; 20-22 Leoforos
Athinon, CY-6014 Larnaca (CY). HANNOUN, Claude
[FR/FR]; 25 rue Périer, F-92120 Montrouge (FR).

(74) Mandataire : BAGGER-Sørensen, Brigitte; Inter-
national Patent-Bureau, Høje Taastrup Boulevard 23,
DK-2630 Taastrup (DK).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AT
(modèle d'utilité), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,

CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (modèle d'utilité), DE, DE
(modèle d'utilité), DK, DK (modèle d'utilité), DM, DZ,
EC, EE, EE (modèle d'utilité), ES, FI, FI (modèle d'util-
ité), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (modèle d'utilité), SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF SEQUESTRANTS FOR TREATING PRION DISEASES

(54) Titre : UTILISATION DE CHÉLATEURS DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES A PRIONS

(57) Abstract: The invention concerns the use of sequestrants for treating prion diseases. Particularly, it concerns sequestrants used for preparing a pharmaceutical composition for treating or preventing prion diseases in human and animal and, more generally, diseases mediated by non-conventional transmissible agents. Clioquinol and phanquone sequestrants are preferred sequestrants for preparing said composition. The invention also concerns methods for treating or preventing prion diseases.

(57) Abrégé : L'utilisation de chélateurs dans le traitement des maladies à prions est décrite. En particulier chélateurs sont utilisés pour la préparation d'une composition pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des maladies à prions chez l'homme ou l'animal et, plus généralement, des maladies provoquées par les agents transmissibles non conventionnels (ATNC). Les chélateurs clioquinol et phanoquinone sont chélateurs préférés dans la préparation de la composition en haut. Méthodes pour le traitement ou à la prévention des maladies à prions sont décrites.

WO 02/051415 A2

Utilisation de chélateurs dans le traitement des maladies à prions.

Domaine technique.

5

La présente invention concerne l'utilisation de deux composés connus utilisés ensemble ou séparément pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des maladies causées par les prions. L'invention décrit une composition pharmaceutique pour un tel traitement. L'invention traite aussi des
10 méthodes de traitement et de prévention des maladies à prions.

Etat des connaissances.

Les maladies causées par les Agents Transmissibles Non Conventionnels (ATNC), ou
15 prions, en particulier les encéphalopathies subaigües spongiformes transmissibles (ESST), atteignent l'homme et les animaux. Elles sont d'une grande gravité car elles sont pratiquement toujours invalidantes et rapidement mortelles lorsqu'elles se déclarent. Il reste de nombreuses incertitudes quant à leur pathogénèse et diverses hypothèses sont avancées, mais la plus vraisemblable est celle dite du "prion", terme qui
20 désigne un agent protéique présentant avec les virus certaines analogies, surtout la faculté de se répliquer, mais sans l'intervention d'acides nucléiques. Si cette théorie se vérifie, il s'agit d'un nouveau type d'agents infectieux pour lesquels les concepts virologiques ne s'appliquent pas. Ces maladies n'ont jusqu'ici pas pu être traitées ni empêchées et elles représentent un grave danger pour la santé humaine et animale.

25

Maladies à Prions (d'après Prusiner, 1998, Proc Natl Acad Sci USA, 95, 13363-13383.).

30

Scrapie
Encéphalopathie transmissible du vison

Mouton et Chèvre
Vison

	Chronic wasting disease	Mule Deer & Elk
	Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)	Bovins
	Encéphalopathie Spongiforme Feline	Chat
	Encéphalopathie Exotique des Ongulés	Nyala et Grand Kudu
5	Kuru	Homme
	Maladie de Creutzfeld-Jakob, classique ou sporadique (MCJc)	Homme
	Maladie de Creutzfeld-Jakob, nouveau variant (MCJnv)	Homme
	Maladie de Gerstmann-Straussler-Scheinker	Homme
	Insomnie familiale fatale	Homme

10

Le problème le plus inquiétant est celui de la Maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) sous sa nouvelle forme. Il existe en effet deux types de MCJ. L'une, dite classique ou sporadique, MCJc, est rare et atteint surtout les sujets âgés. L'autre, d'apparition récente

15 est très vraisemblablement due à la contamination humaine à partir d'agents pathogènes animaux (bovins) et elle atteint des sujets de tous âges. L'épizootie de « maladie de la vache folle » en Grande Bretagne ou Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), depuis 1995, a été suivie par l'apparition d'une nouvelle maladie humaine, identifiable par certains caractères cliniques et anatomo-pathologiques, désignée par le terme

20 MCJnv (pour nouveau variant). Elle s'est ensuite manifestée aussi dans plusieurs pays européens dont la France. Pendant quelques années, la maladie humaine est restée peu fréquente, quelques cas humains seulement, et n'a donc pas suscité beaucoup d'intérêt en ce qui concerne le développement de médicaments préventifs ou curatifs. Chez l'animal, le problème était quantitativement plus important (scrapie chez le mouton;

25 ESB chez les bovins: plus de 180 000 cas en Grande Bretagne en 10 ans), mais il est difficile d'envisager de traiter les animaux malades puisqu'ils sont destinés à l'alimentation humaine et on ne pourrait pas consommer un animal guéri en raison du risque de persistance ou de latence de l'agent malgré la guérison clinique.

Les estimations relatives au risque de développement d'une épidémie humaine de

30 MCJnv en rapport avec la maladie bovine (Encéphalopathie bovine spongiforme, BSE) ont donné des résultats très variables car les modèles prévisionnels comportent plusieurs

paramètres dont l'évaluation empirique est très difficile. Selon les estimations anglaises du début de l'année 2000, le nombre des cas dans les 20 prochaines années pouvait se situer dans une fourchette de 100 à 20 000 cas. En l'absence de tout traitement, la perspective était donc déjà préoccupante.

5

L'évolution de la maladie humaine est très lente (jusqu'à 20 ans d'incubation) et les études sont très difficiles en raison de l'absence de modèles animaux entièrement satisfaisants. Le rythme d'apparition de nouveaux cas modifie sans cesse les paramètres de la prévision et les valeurs estimées sont modifiables en permanence. Or, depuis
10 quelques mois, la courbe de morbidité est en train de s'infléchir dangereusement et elle monte rapidement au Royaume Uni:

1999: 17 cas humains de CJD^{nv}

2000: en un semestre seulement, 24 cas

15

La modélisation donne maintenant des valeurs limites inférieures et supérieures dans une fourchette de 63 000 à 136 000 cas au total (valeurs basse et haute de la fourchette). Certains experts sont encore plus pessimistes et envisagent 500 000 cas. Ces résultats s'affineront avec le temps en fonction de l'évolution réelle de la morbidité (-mortalité).
20 L'introduction de nouveaux tests de dépistage permettra d'avoir une meilleure estimation et surtout de mesurer plus rapidement l'étendue du danger.

Les données du problème ont donc changé récemment. On considère maintenant qu'il pourrait s'agir d'une maladie relativement fréquente, atteignant tous les âges. Il devient
25 beaucoup plus urgent de développer des solutions. Il faudra plusieurs années pour connaître le devenir de cette épidémie, mais dans l'intervalle, le besoin de disposer d'agents thérapeutiques est maintenant plus pressant.

30

ETAT DE L'ART: MÉCANISMES PATHOLOGIQUES DANS LES MALADIES À PRIONS, LA MODIFICATION CONFORMATIONNELLE.

La maladie est associée à la présence et à l'accumulation d'une protéine modifiée,
5 dérivée d'une protéine normale PrPc, dans le cerveau des sujets atteints. La protéine
PrPc existe dans toutes les espèces où elle a été recherchée et sa variation
interspécifique est faible. On a retrouvé des protéines analogues chez les mammifères,
les oiseaux et les poissons.

La transformation de la PrPc en PrPsc se fait par un simple changement de la structure
10 tridimensionnelle de la molécule normale. Cette modification est transmissible à de
nouvelles molécules de PrPc et le mécanisme de la transformation est obscur. Il s'agit
d'une transition conformationnelle de la forme normale PrPc constituée principalement
de structures en hélice alpha en une protéine pathologique, absente chez les sujets sains
composée d'une majorité de feuillets bêta plissés (Cohen, 1999, J.Mol.Biol., 293: 313-
15 320). Bien que leurs séquences soient identiques, la PrPsc est résistante à la protéinase
K alors que la PrPc est sensible, ce qui permet leur identification.

La forme anormale de la protéine prion, désignée par le terme PrPsc possède des
propriétés physicochimiques différentes de la forme normale. Elle résiste à la digestion
20 par les enzymes protéolytiques et possède en excès l'un de ses deux composants, les
feuillets bêta. La réplication du prion semble liée à l'interaction de la structure de la
protéine prion normale de l'organisme hôte PrPc avec la protéine modifiée PrPsc. La
plupart des encéphalites spongiformes transmissibles (ESST) sont liées à la structure de
cette protéine anormale: elles s'accompagnent d'une accumulation et d'un dépôt, au
25 niveau cérébral, de molécules de PrPsc polymérisées sous la forme de fibrilles.

Wadsworth et al. (Nat Cell Biol, 1999, 1:55-59) ont montré que les deux types de PrPsc
humaines, rencontrées dans les deux sous-types de la maladie de Creutzfeld-Jakob,
peuvent être transformées l'une en l'autre par l'altération de la teneur en ions
30 métalliques. La dépendance de la conformation de la PrPsc et de l'attachement d'ions
métalliques comme le cuivre ou le zinc représente un nouveau mécanisme de

modification post-traductionnelle rendant possible la génération de souches multiples de prions avec toutes les implications que cela représente à la fois pour la classification moléculaire et la pathogénèse des maladies à prions.

- 5 Plusieurs travaux ont montré que la protéine PrPc était une métalloprotéine capable de fixer, au niveau d'une répétition d'un octapeptide, une molécule de cuivre(II). C'est précisément à ce niveau de la protéine que se produit la modification de conformation qui mène au prion. Il est donc possible de penser que le cuivre intervient dans la transformation de PrPc en prion PrPsc.

10

- Hornshaw et al. (Biochem Biophys Res Comm, 1995, 207, 621-629) ont montré que la protéine PrPc, présente chez les mammifères, qui se transforme, par modification des structures moléculaires secondaire et tertiaire, en protéine prion infectieuse (PrPsc), contenait 3 ou 4 copies d'une séquence octopeptidique (PHGGGWGQ¹). Cette séquence
15 est localisée dans un domaine très conservé de la partie N-terminale et elle lie les ions cuivre de façon préférentielle. Cette liaison est dépendante de la concentration de cuivre. Chez le poulet, une séquence hexapeptidique (NPGYPH²) a la même propriété de liaison au cuivre. Dans une seconde publication, ils montraient un effet de la liaison des ions Cu²⁺ sur la structure secondaire de peptides synthétiques Octa4 et Hexa4
20 correspondants aux peptides naturels de PrP de mammifères et de poulet (Hornshaw et al., BBRC, 1995, 214, 993-999). L'addition de cuivre induit une augmentation du "random coil". La fluorescence de ces deux peptides est quenchée par le cuivre, alors que cette propriété n'apparaît pas avec d'autres cations divalents.

- 25 Des résultats similaires étaient obtenus par Stockel et coll. (Biochem, 1998, 37, 7185-7193). En utilisant la protéine prion du hamster syrien (SHaPrP), ils montrent par spectroscopie par dichroïsme circulaire en proche UV et par fluorescence au tryptophane un décalage des spectres vers les plus courtes longueurs d'onde et

¹ Proline-histidine-glycine-glycine-glycine-tryptophane-glycine-glutamine.

² Asparagine-proline-glycine-tyrosine-proline-histidine.

l'induction de changements de l'émission de fluorescence du tryptophane, ce qui confirme que le Cu^{2+} modifie la structure de la molécule. Cet effet est spécifique du cuivre car il n'y a pas d'effet par Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} . La liaison avec le cuivre entraîne la modification conformationnelle d'une forme prédominante
5 alpha-hélicale en une structure en feuillet beta. La dialyse à l'équilibre indique qu'environ 2 molécules de cuivre s'attachent par molécule de PrP aux concentrations de cuivre physiologiques. D'après l'étude de l'influence du pH, l'histidine pourrait jouer un rôle dans le phénomène de ligation. Ces résultats suggèrent que chaque molécule de cuivre s'attacheraient à deux octopeptides (PHGGGWGQ) avec une histidine et peut-
10 être une glycine qui chélatent l'ion. La liaison de deux molécules produirait une modification de la structure moléculaire de cette région.

Miura et coll. (Biochem, 1999, 38, 11560-11569) ont confirmé la liaison préférentielle de Cu^{2+} au voisinage de la séquence octopeptidique. L'étude par spectroscopie Raman
15 et d'absorption montre qu'à pH neutre, l'octopeptide forme un complexe 1:1 avec l'ion Cu^{2+} par l'histidine et le peptide triglycine. A pH acide faible, la liaison est modifiée et le site de fixation passe du Npi de l'histidine au Ntau et un ion cuivrique est attaché à deux résidus histidine de chaînes peptidiques différentes. Le microenvironnement dans la cellule cérébrale régule l'affinité pour l'ion Cu^{2+} au cours du transfert entre la surface
20 cellulaire et les endosomes. Ainsi, on peut envisager que le pont His(Ntau)- Cu^{2+} -His(Ntau) intervienne dans l'agrégation de la PrPc.

Il est possible que les fonctions de PrP en tant que transporteur d'ions $\text{Cu}(\text{II})$ soient de lier les ions cuivre à partir du milieu extracellulaire dans les conditions physiologiques et d'en relacher tout ou partie lors de l'exposition à un pH acide dans les endosomes ou
25 les lysosomes secondaires (Whittal et al., Protein Sci, 2000, 9:332-343).

Des résultats récents montrent que la protéine prion joue un rôle important dans le système nerveux central. Aronoff-Spencer et al. (Biochem, 2000, 39, 13760-13771) pour étudier le site et le mode spécifique de fixation du cuivre ont utilisé une série de
30 complexes $\text{Cu}(\text{II})$ -peptides composés de 1-, 2- ou 3- octopeptides par résonance paramagnétique et spectroscopie circulaire dichroïque. Ils ont ainsi montré que le cuivre

est lié à l'azote de la chaîne latérale histidine-imidazole et à deux azotes de l'amide séquentielle de glycine.

5 Viles et coll. montraient par dichroïsme circulaire visible la modification structurale de la région des quatre octapeptides en tandem à la suite de la fixation de Cu^{2+} (Viles et al., PNAS, 1999, 96, 2042-2047). Ces résultats sont aussi confirmés par la spectroscopie protonique RMN: deux peptides forment un pont entre les azotes des cycles imidazole de deux résidus d'histidine (Nepsilon2 et Ndelta1).

10 Un mode d'action possible de la liaison du cuivre a été suggéré par Shiraishi et coll (Shiraishi et al., BBRC, 2000, 268, 398-402) qui ont montré que l'activité catalytique de Cu^{2+} était complètement supprimée lorsqu'il était sequestré par la liaison avec la PrP. Son intervention dans les processus oxydatifs cellulaires est alors impossible.

15 **ETAT DE L'ART: LES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES.**

De nombreuses approches ont été explorées pour trouver des agents capables de prévenir ou d'arrêter la transformation moléculaire menant à la maladie. Des effets encourageants ont été obtenus dans certaines études expérimentales avec des produits
20 découverts empiriquement, mais jusqu'à présent sans résultats pratiques concrets permettant des applications. Les principales classes de médicaments envisagés pour inhiber le développement des ATNC étaient les polyanions, le rouge de Congo (composé anionique colorant de l'amyloïde), les antibiotiques polyenes (amphotéricine, MS 8209), l'anthracycline, la dapsone.

25

Plus récemment, on a aussi envisagé d'inhiber ou d'inverser la transformation de la protéine normale en prion grâce à des peptides synthétiques qui peuvent casser les feuillets bêta (C.Soto, Lancet, 2000, 355, 192-197). Cependant des difficultés sont apparues qui empêchent l'utilisation de ces composés. D'abord, ils sont rapidement
30 dégradés par les peptidases cellulaires, ensuite, ils entraînent des effets immunologiques inappropriés car ils sont antigéniques, et enfin, ils traversent difficilement la barrière

hémato-méningée qui isole le cerveau de la circulation sanguine générale pour le protéger des infections et ils ne peuvent parvenir à l'endroit où leur action serait utile.

Le procédé que nous envisageons est tout différent dans son principe. Il est extrêmement simple et il utilise des médicaments déjà connus pour d'autres propriétés.

CORPS DE L'INVENTION: UTILISATION D'UN CHÉLATEUR DU CUIVRE ET DU ZINC.

10

Nous disposons de deux agents chimiques, bien connus et déjà utilisés pour d'autres usages, le clioquinol et la phanquinone. Ces composés ont la propriété de passer facilement la barrière hémato-encéphalique et ce sont des ligands du cuivre et du zinc. Ils ont déjà été proposés dans des indications qui présentent certaines analogies, dans le traitement de maladies dégénératives du système nerveux, notamment la maladie d'Alzheimer (AD) où intervient probablement le zinc dans une configuration analogue. D'après les connaissances actuelles sur la pathogénèse des maladies neurodégénératives à prions, il apparaît que la séquestration du cuivre et peut-être du zinc dans le tissu cérébral peut se révéler bénéfique pour inhiber la formation des feuillets bêta de la PrP et limiter sa transformation en PrPsc qui est la forme trouvée dans ces maladies. Nous proposons l'utilisation de ces produits pour le traitement des maladies dues à des agents non-conventionnels dont la pathogénèse fait intervenir le cuivre.

Les encéphalopathies à prions, comprenant entre autres la tremblante (scrapie) et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) chez le bétail, le kuru et les maladies de Creutzfeld-Jakob et le syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker chez l'homme, sont des affections neurodégénératives caractérisées par une perte précoce de protéines synaptiques, l'astrocytose, une perte progressive des fonctions neurologiques et, souvent, une agrégation et de protéines cérébrales avec formation de dépôts. Toutes ces maladies semblent être causées par une transition conformationnelle post-traductionnelle d'une isoforme normale de la protéine prion (PrPc) en forme anormale et

pathogène (PrP^{sc}). Le cuivre est directement associé à la physiopathologie du prion. Jusqu'à maintenant, on connaissait peu de choses sur les fonctions normales de la protéine PrP dans le cerveau et il y a maintenant un ensemble de preuves de l'intervention de la PrP dans le métabolisme du cuivre. Il a aussi été démontré que les

5 cellules cérébrales de souris déficientes en PrP sont plus sensibles aux stress oxydatifs et à la carence en cuivre.

La base de l'invention repose sur la recherche de molécules douées des propriétés suivantes.

10

Démontrer une activité chélatrice vis-à-vis du cuivre et du zinc;

Présenter des propriétés lipophiles;

Avoir une capacité de pénétration permettant de passer facilement la barrière hémato-méningée;

15 Présenter des propriétés pharmacologiques permettant une administration orale dans des préparations appropriées;

Présenter un profil de sécurité pour l'administration humaine documenté par une expérience clinique leur donnant un ratio bénéfice/risque acceptable pour le traitement des maladies à prions;

20 Posséder un pouvoir chélateur faible vis-à-vis des autres métaux d'importance physiologiques (fer, calcium, magnésium,...);

Présenter une distribution satisfaisante dans le cerveau;

Présenter une distribution satisfaisante dans les cellules parenchymateuses

Démontrer une réduction satisfaisante du stress oxydatif dans le cerveau.

25

Nos recherches nous ont menés à la découverte de deux chélateurs connus, le clioquinol et la phanquinone, qui satisfont aux critères énoncés ci-dessus. Ces deux molécules ont en commun un fort pouvoir chélateur sur le cuivre et le zinc: cependant, le clioquinol s'associe plus fortement au zinc et la phanquinone s'associe plus fortement au cuivre.

30 Leurs effets chélateurs sur le fer, le calcium et le magnésium sont faibles ou négligeables. Dans le cas des maladies à prions, le cuivre sera la cible principale.

Le clioquinol³ administré par voie intraveineuse pénètre très efficacement dans le système nerveux, ce qui indique qu'il n'y a pas de barrière méningée pour ce type de produit (Shiraki, 1979, Handbook of Clinical Neurology, 37, 115, 139).

- 5 L'administration de 250 mg de clioquinol par voie orale chez l'homme donne des concentrations plasmatiques de 1 à 5 µg/ml. Dans d'autres expériences, Les doses de 7,4 à 9,3 mg/kg/jour ont donné des concentrations de 2,7 à 5,8 µg/ml dans le plasma (Shiraki, 1979, loc.cit.).

- 10 La phanquinone⁴ a aussi été administrée à des doses de 50 mg trois fois par jour dans le passé induisant des niveaux plasmatiques et des effets cliniques satisfaisants.

C'est la nature lipophile de ces molécules qui leur permet d'être bien absorbées par voie orale, de passer la barrière hémato-méningée et de se retrouver dans le cerveau. Les données obtenues chez la souris montrent que 18 heures après l'administration de Zn65
15 par voie intrapéritonéale, un grand nombre de grains contenant du zinc s'accumulaient sur les terminaisons des cellules granulaires et leurs prolongements ainsi que sur les cellules pyramidales de l'hippocampe. Les grains de zinc se trouvaient surtout au niveau des vésicules synaptiques et moins fréquemment sur les mitochondries des présynapses
20 des terminaisons « mossy », mais pas sur les protosynapses des cellules granulaires et pyramidales ou leurs prolongements dans l'hippocampe.

Il a été démontré précédemment que les fibrilles amyloïdes de l'amyloïde bêta, de l'amyline et de la calcitonine étaient neurotoxiques et que, dans les maladies à prions, l'accumulation de la PrPsc et/ou le dépôt d'amyloïde étaient associés, dans le temps et
25 dans l'espace, avec la dégénérescence neuronale et l'astrogliose.(Rainer & Good, 2000, J Neurochem, 75, 2536-2545.) de plus, il a été démontré dans la tremblante que les titres

³ Clioquinol 30-26-7, C₉H₅ClINO, iodochlorohydroxyquinol, iodochlorohydroxyquinoline, chloroiodoquine, 7-iodo-5-chloro-8-hydroxyquinoline, 5-Chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline, 5-Chloro-7-iodo-8-quinolinol, 5-Chloro-8-hydroxy-7-iodoquinoline,

⁴ Phanquinone 84-12-8, C₁₂H₆N₂O₂, dihydro-5,6 phenanthroline-4,7 dione-5,6, phanquone, phenanthroline quinone, phenantrolinquone, pheninquone

les plus élevés de la PrPsc infectieuse étaient associés avec des fractions membranaires et que la PrPsc accroissait les microvillosités membranaires.

Des rapports récents (Wong, 2000, Bioch Biophys Res Comm, 275, 249-252) suggèrent que l'un des mécanismes de la pathogénèse des maladies à prions pourrait être le déséquilibre des réactions catalysées par des métaux, qui sont le dénominateur commun de plusieurs maladies neurodégénératives. Ces déséquilibres causent une altération des fonctions antioxydantes ce qui a pour effet d'augmenter le stress oxydatif.

Des exemples de l'activité cérébrale de la phanquinone et du clioquinol ont déjà été présentées dans un autre brevet (WO 99/09981). En présence de concentrations croissantes de phanquinone à partir de 0,1 µg/ml, l'effet toxique de l'amyloïde A bêta (25-35) est fortement diminué et même complètement aboli à la concentration de 1 µg/ml de phanquinone.

Les données du WO 99/09981 publiées sous le traité PCT montrent que le clioquinol comme la phanquinone réduisent la neurotoxicité dans le cerveau en sequestrant le zinc et le cuivre. La chélation de ces métaux est la base du traitement décrit ici contre les maladies humaines à prions.

Un traitement idéal des maladies à prions demande une molécule ayant la capacité de réduire le stress oxydatif dans le cerveau, de décroître la liaison His(Ntau)-Cu-His(Ntau) et la limitation de la formation des feuillets beta. Toutes ces activités sont liées au cuivre dans le cerveau la chélation de ce métal et la diminution de la quantité disponible localement doit agir sur la réduction du changement conformationnel qui assure la transition de la PrPc à la PrPnv. De plus, la chélation du cuivre et du zinc aura un effet antioxydant dans le cerveau en réduisant le clivage de l'oxygène réactif qui est sous la dépendance du cuivre.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION.

L'utilisation de la phanquinone et/ou du clioquinol est revendiquée pour le traitement
5 et/ou la prévention des maladies à prion chez l'homme ou les animaux. Ces deux molécules ont déjà été utilisées pour d'autres indications chez l'homme et sont relativement sûres d'emploi.

Ces deux molécules sont des chélateurs de métaux dont le cuivre. La phanquinone est plus efficace pour fixer le cuivre que le clioquinol.. Ces deux produits ont été proposés
10 pour le traitement de la maladie d'Alzheimer en raison de cette propriété chélatrice du zinc et du cuivre et pour réduire les réactions oxydatives dans le cerveau. L'amyloïde de la maladie d'Alzheimer est agrégé en présence surtout de zinc, mais aussi de cuivre et le clioquinol et la phanquinone, utilisés pour la chélation des deux métaux, bloquent le processus d'agrégation de l'amyloïde ainsi que la formation de plaques.

15 Nous proposons donc ici l'utilisation du clioquinol et de la phanquinone séparément ou en combinaison dans le traitement de maladies provoquées par des agents transmissibles non-conventionnels (ATNC) faisant intervenir des mécanismes physiopathologiques dans lequel le cuivre (et/ou le zinc) est impliqué. L'utilisation du clioquinol et de la phanquinone fait l'objet de la présente demande de brevet.

20 L'utilisation du clioquinol et de la phanquinone est justifiée par leurs différents spectres de chélation du zinc et du cuivre. La combinaison des deux pourrait offrir une capacité de chélation maximale car les deux métaux peuvent être impliqués dans le processus de changement conformationnel de la molécule de PrPc en molécule pathologique PrPsc. De plus, un effet antioxydant sera obtenu dans le cerveau par la sequestration du cuivre
25 et la réduction de l'oxygène réactif.

Le chloroquinol est un médicament connu pour ses propriétés anti-amibiennes et anti-bactériennes et il a été utilisé largement dans le passé pour ces indications. Il est connu
30 pour avoir une activité de chélation de métaux tels que le zinc, le fer, le manganèse, le cuivre, le mercure, le nickel, et le cobalt. Les propriétés physicochimiques du

clioquinol ont confirmé son activité chélatrice (Tateishi et al., 1973, Psychiatr Neurol , 75, 187-196)

Les préparations injectables de clioquinol ont été signalées comme permettant un
5 passage efficace du produit dans le cerveau en traversant la barrière hémato-méningée et en atteignant dans le cerveau des concentrations de l'ordre de 20µg/ml après injection par voie intra-veineuse de 20 mg/kg (Tateishi et al, 1973, loc. cit., Tamura, 1975, Jap J Med Sc Biol, Suppl 28, 69-77). La concentration de clioquinol est également élevée dans des régions du cerveau comme l'hippocampe qui sont directement impliquées dans
10 la maladie d'Alzheimer.

Lorsque du clioquinol marqué par de la radioactivité est administré per os à la souris, on peut déceler la radioactivité pendant trois heures seulement dans le système nerveux central. Les résultats expérimentaux montrent que le clioquinol injecté par voie intraveineuse pénètre rapidement dans le système nerveux et peut aussi être excrété
15 rapidement.(Shiraki, 1979, loc.cit.). Ce fait justifie l'emploi du clioquinol pour l'inhibition de la précipitation de l'amyloïde et la clearance du zinc ou d'autres métaux du cerveau et notamment des zones affectées par la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions.

20 Le clioquinol a été administré dans le passé à des doses de 250 mg trois fois par jour pendant des périodes allant jusqu'à trois mois dans le traitement de l'amibiase intestinale, et il a été utilisé largement pour traiter les diarrhées aiguës. La seule toxicité rapportée après plusieurs millions de traitements au cours de plusieurs dizaines d'années a été l'observation faite au Japon après l'administration de doses excessives pendant des
25 périodes atteignant deux ans. La posologie utilisée comprenait une administration de 23 à 50 mg/kg/jour pendant des durées de 13 à 313 jours. De nombreux sujets ont présenté une manifestation de neurotoxicité subaigue avec démyélinisation du nerf optique (subacute myelo-optic neurotoxicity = SMON). Cette neurotoxicité a été récemment attribuée à une interférence avec le métabolisme et le transport de la vitamine B12.

30 Pour prévenir ces effets indésirables, on pourra utiliser un agent protecteur ou un groupe prosthétique, comme la vitamine B12, administré avant, pendant ou après le ou les

produits actifs. La quantité devra être suffisante pour empêcher les effets indésirables de l'administration du clioquinol ou de la phanquinone, aux doses de 5µg à 1 mg par jour pour la vitamine B12.

La capacité du clioquinol à abolir l'agrégation de l'amyloïde A bêta a été vérifiée de façon expérimentale. En présence de zinc (30µM) la solubilité de l'A bêta est réduite (2,5µM en TBS à pH7,4) de 95% à 43%. Lorsqu'on ajoute du clioquinol (120µM) au complexe zinc-A bêta, l'agrégation de l'A bêta est réduite de 43% à 70%. Ainsi, l'administration de clioquinol doit sequestrer le zinc et d'autres métaux lourds dans le cerveau grâce à son caractère lipophile qui lui permet d'induire des concentrations relativement élevées dans le cerveau et le liquide céphalo-rachidien.

La phanquinone a été utilisée chez l'homme pour lutter contre divers agents: amibes, trichomonas, giardia, et plus généralement comme antiseptique et antiparasitaire. Ce médicament a été largement utilisé seul comme antidiarrhéique et aussi en combinaison avec le clioquinol dans les mêmes indications.

La phanquinone n'a montré aucun effet toxique après administration de doses de 150 mg par jour pendant des périodes allant de trois semaines à six mois.

Récemment, des recherches extensives ont été menées pour étudier l'effet de la phanquinone et du clioquinol pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Les résultats expérimentaux montrent que le clioquinol a la propriété de séquestrer plusieurs métaux lourds in vivo et dans le cerveau, tout particulièrement le cuivre et le zinc. De même, la phanquinone a la capacité de séquestrer le zinc et le cuivre dans le cerveau. La capacité à lier le cuivre est trois fois plus forte pour la phanquinone que pour le clioquinol. En revanche, le clioquinol lie le zinc au moins deux fois mieux que la phanquinone. Il a été montré de plus que la phanquinone, comme le clioquinol ont les mêmes propriétés favorables pour empêcher la formation d'amyloïde et pour assurer la resolubilisation de l'amyloïde dans le cerveau.

En fonction des études démontrant que clioquinol et phanquinone étaient de puissants chélateurs du zinc et du cuivre, et des résultats récents montrant que, dans la maladie

d'Alzheimer, la précipitation de l'amyloïde n'a lieu qu'en présence de zinc et de cuivre, des recherches sont menées pour étudier les effets de ces deux molécules dans le traitement de cette maladie. La capacité des deux molécules à empêcher la précipitation de l'amyloïde dans le cerveau et aussi de redissoudre les dépôts d'amyloïde précipités
5 dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer est en cours de démonstration.

Il y a de nombreuses preuves que l'accumulation d'amyloïde A bêta dans le cerveau est liée à la cause de la maladie d'Alzheimer. L'A bêta, un composant normal des fluides biologiques, s'accumule sous divers aspects allant de plaques très peu solubles à des
10 dépôts qui peuvent être extraits des tissus post-mortem par des tampons salins. Les facteurs responsables de cette accumulation sont inconnus pour la plupart, mais cette situation présente certaines analogies avec celle des dépôts amyloïdes dans les maladies à prions.

L'amyloïde A bêta est vulnérable à trois facteurs: la présence de zinc, de cuivre ou d'un
15 pH légèrement acide (Bush, 1994). Ainsi, la précipitation de l'A bêta par le cuivre est très exagérée dans des conditions de pH à 6,9.

Les conclusions de ces expériences peuvent s'interpréter de la façon suivante. Des métaux divalents, très probablement le zinc surtout, maintiennent l'A bêta à l'état
20 insoluble à la fois chez les sujets sains et les sujets malades ce qui suggère un rôle de l'A bêta dans l'homeostase. D'autres métaux comme le calcium ou le magnésium peuvent agir pour maintenir A bêta dans l'état soluble. Un traitement doux de tissus provenant de sujets atteints de la maladie et contenant des dépôts d'A bêta par l'agent chélateur permet une rapide solubilisation de ces dépôts. On peut penser que des dépôts
25 éphémères d'A bêta agrégé seraient présents à la fois chez les patients atteints de la maladie et chez les sujets sains et qu'ils sont en permanence précipités et resolubilisés. Ils ne sont sans doute décelables que par coloration immunohistologique de fond. L'acidose lactique cérébrale qui complique la maladie d'Alzheimer pourrait être l'un des facteurs qui contribuent à la précipitation de l'A bêta et ce phénomène pourrait être
30 sous la dépendance de la présence de cuivre. On sait par ailleurs que la régulation de la concentration en zinc et en cuivre est anormale dans la maladie d'Alzheimer. Ces

5 résultats suggèrent que les chélateurs de métaux auront un effet thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer et serviront d'agents prophylactiques en réduisant la charge en A bêta en clinique. Le clioquinol est l'un des seuls chélateurs qui soit enrichi dans le cerveau en raison de son hydrophobicité, ce qui en fait un excellent candidat pour le développement d'essais cliniques.

Récemment, il a été montré que ces métaux faisaient partie intégrante des dépôts d'A bêta dans le cerveau des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer. Il a été montré aussi que les chélateurs spécifiques du zinc et du cuivre pouvaient redissoudre de façon spectaculaire une proportion significative d'A bêta dans des tissus provenant de
10 prélèvements post-mortem sur des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer par comparaison avec la quantité extraite par un tampon témoin ne contenant pas de chélateurs. Enfin, les premiers essais cliniques conduits chez des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer en utilisant le clioquinol à raison de 10 et 40 mg deux fois par jour ont montré des modifications et des améliorations biochimiques et cliniques.

15 Ces résultats permettent une extension des applications des chélateurs concernés pour la prévention et le traitement des maladies à prions et des encéphalites spongiformes subaiguës puisque les résultats obtenus avec la maladie d'Alzheimer montrent que le clioquinol pénètre effectivement dans le cerveau, au moins chez les patients étudiés et que leur activité chélatrice provoquait d'importantes modifications biochimiques.

20

La phanquinone a déjà été utilisée largement dans le passé pour le traitement de diarrhées infectieuses et pour le traitement de la giardiase. Ce produit a montré qu'il avait une activité biologique sur le cerveau en provoquant des modifications comportementales. Il a été utilisé aussi en combinaison avec le clioquinol dans les
25 mêmes indications que le clioquinol. Il est capable de sequestrer le zinc et le cuivre dans le cerveau. La chélation du cuivre est trois fois plus efficace que celle du clioquinol. Les propriétés d'inhibition de la formation d'amyloïde et la redissolution dans le cerveau ont aussi été démontrées.

Des essais cliniques d'application de la phanquinone au traitement de la maladie
30 d'Alzheimer ont été récemment entrepris. La phanquinone n'a pas d'effets toxiques à des doses allant jusqu'à 150 mg par jour pendant trois semaines à six mois.

Nous proposons l'utilisation de ces produits chélateurs pour le traitement d'un sujet humain ou animal présentant ou pouvant présenter une condition pathologique pouvant relever de l'action de prions, consistant à administrer aux susdits sujets une quantité de
5 clioquinol ou de phanquinone ou d'une combinaison des deux suffisante pour empêcher l'action des prions, ainsi qu'un composé ou un mélange de composés sélectionné parmi des sels métalliques ou des groupes prosthétiques différents du clioquinol et de la phanquinone possédant une autre activité vis à vis de la maladie à prion en quantité suffisante pour empêcher les effets indésirables de l'administration du clioquinol. Ces
10 produits, comme la vitamine B12 seront utilisés à raison de 5 µg à 1mg de 5 µg à 250 mg pour d'autres.

Le clioquinol, la phanquinone et les composés annexes seront présentés dans une seule préparation pharmaceutique ou seront administrés simultanément, ou séquentiellement dans des ordres divers. Lorsqu'ils seront administrés séquentiellement, les périodes
15 d'administration pourront être de trois ou quatre semaines. Le clioquinol et la phanquinone pourront être formulés pour utilisation par voie orale ou parentérale ensemble ou séparément.

Selon les considérations exposées précédemment, nous proposons l'utilisation du
20 clioquinol à des doses de 1 à 1000 mg ou de phanquinone à des doses de 1 à 1000 mg pour la prévention et/ou le traitement des encéphalopathies spongiformes chez l'homme et l'animal. Le clioquinol peut aussi être utilisé en monothérapie à des doses de 250 à 500 mg quatre fois par jour avec possibilité d'augmentation jusqu'à 1000 mg trois fois par jour. De même, la phanquinone peut être utilisée en monothérapie à des doses de 10
25 à 250 mg qui peuvent être portées à 500 mg trois fois par jour. Les préparations pharmaceutiques pourront être administrées par voies orale, parentérale ou intradermique.

Une combinaison des deux molécules peut assurer un effet plus puissant sur le ligand du cuivre et du zinc du PrPc dans le but de bloquer la transition moléculaire menant à l'état
30 pathologique. La combinaison proposée est de 250 mg de clioquinol et 50 mg de phanquinone trois fois par jour par administration orale. Dans la combinaison, le

clioquinol peut être donné à des doses de 10 à 1000 mg et la phanquinone à 10 à 250 mg.

Exemple 1

5

Préparation d'une composition pharmaceutique contenant clioquinol, phanquinone et vitamine B 12.

250 g de phanquinone et 250 g de clioquinol sont mélangés à 200 g de N'-(4-stéateryl-
10 aminophenyl)-triméthylammonium methyl sulfuric acid et 1025 g de lactose mono-
hydrate pendant 5 minutes. On ajoutera 300 g d'eau bouillante en une seule fois à un
mélange de 100 d'amidon de maïs en suspension dans 100 g d'eau froide. La suspension
d'amidon refroidie à 40°C est ajoutée au mélange des poudres de phanquinone et de
clioquinol sous agitation continue. Ensuite, on ajoute au mélange une solution aqueuse
15 de 5 g de vitamine B 12. Le mélange est granulé en utilisant un tamis de mailles de 2,5
mm et on dessèche pendant 18 heures à 40°C. Les granules secs sont mélangés à 400 g
d'amidon de maïs et 20 g de stéarate de magnésium. Le mélange final est formulé en
comprimés d'un diamètre de 8,0 mm et un poids de 500 mg.

20

Il existe d'autres chélateurs de métaux qui pourraient être utilisés dans le traitement et la
prévention des encéphalites spongiformes en fixant de la même manière le zinc et le
cuivre et/ou d'autres métaux dans le cerveau en plus de la phanquinone et du clioquinol,
auxquels nous étendons la revendication et dont la liste suit.

25 Hydroxyquinoline (oxine), 5-méthyl-oxine (5-méthyl-8-hydroxyquinoline), 2-
mercaptopyridine-N-oxide, (2-mercapto-quinoline-N-oxide), 2-mercapto-4-n-propyl-
pyridine-N-oxide, Nitroxoline, 2-hydroxypyridine-N-oxide, 2-hydroxyquinoline-N-
oxide, 2-Hydroxy-4-méthyl-5:6-benzoquinoline-N-oxide, 5-méthyl-8-hydroxy-
quinoline, 8-hydroxy-quinoline-7-carboxylic acid, Hydroxy-quinoline sulfate, Chlor-
30 hydroxy-quinoline, 8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid, (dichloro-acetyl)-6-(2-
furoyloxy)-1,2,3,4-tetrahydro-quinoline, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide or 2-n-

heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide, 4-hydroxy-quinoline-3-carboxylic acids (7 substituted benzyl-oxy, phenethyl-oxy or phenoxy-ethoxy), 6-hydroxy-quinoline, 6-nitroquinoline, 8-nitroquinoline, 6-methylquinoline, 8-methylquinoline, 8-hydroxyquinoline, 5,7-dibromo-quinoline, 2-n-nonyl-4-hydroxy[3-3H]quinoline, N-oxide 2n-nonyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide, 7-nitroso-8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid sodium salt, 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline, 2,2',2''-terpyridine, 8-hydroxyquinoline 5-sulfonic acid, 5-formyl-, 5-iodo-, 5-fluoro-, 5-acetyl-, and 5-methoxymethyl-8-hydroxyquinoline, Methyl-5(8-hydroxyquinolyl)acetate, Ethyl 5-(8-hydroxyquinolyl)acetate-trihydroxyquinoline, 5-nitro-8-hydroxyquinoline, 4-hydroxyquinoline, 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline, 3-acetaldehyde to 4-hydroxyquinoline, 4-hydroxyquinoline-3-carboxylates, 5-phenylethyl-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids, 2-n-alkyl-4-hydroxyquinoline, 2-methyl-8-hydroxyquinoline, dibromo-8-hydroxyquinoline-5,7 dibromo-8-bezoil-oxyquinoldine, Arylglyoxal N-7-amino-5-substituted 8-hydroxyquinoline hemiacetals, 5-phenylglyoxylidenamin-8-hydroxyquinolines, Ethylenediaminetetraacetic acid, O-phenanthroline, 1,10-phenanthroline, 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline, alpha, alpha'-dipyridyl, 2,2',2''-tripyridine, (2'-hydroxyphenyl) pyridine, (2'-Hydroxyphenyl) imidazoline, (2'-Hydoxynaphthyl-3'-)imidazoline, Hydrazine-N:N-diacetic acid, Quinoline derivatives carrying carbon, sulfur or phosphorus substituents, and furaquinolines obtained from clioquinol by radical chain nucleophilic substitution reactions, Dehydracetic acid (3-acetyl-2-hydroxy-6-methyl-³-pyrone), 3-propionyl-2-hydroxy-6-ethyl-³-pyrone), 3-butyryl-2-hydroxy-6-propyl-³-pyrone), 2-aminophenol, 4-butyl-2-aminophenol, Rhodotorullic acid, Mycobactin P, 8-hydroxyquinoline-7-carboxylate, 5-substituted 8-hydroxyquinolines, 5-formyl-, 5-iodo-, 5-fluoro-, 5-acetyl-, and 5-methoxymethyl-8-hydroxyquinoline, Methyl-5(8-hydroxyquinolyl)acetate, Ethyl 5-(8-hydroxyquinolyl)acetate, 2,6-dihydroxyquinoline, 2, 5, 6 -trihydroxyquinoline, 5-formyl-1-methoxycarbonyl-4,6,8-trihydroxyphenazine, 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline, 5-chlor-8-hydroxyquinoline, 4-hydroxyquinoline, 5- or 7-methylthio-8-hydroxyquinoline, 6-, 7-, or 8-substituted-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids, 4-hydroxyquinoline-2 and -3-carboxylic acids, 5-phenylethyl-4-hydroxyquinoline-3-substituted carboxylic acids, 2-n-alkyl-4-hydroxyquinoline derivates, 5-7 dibromo-8-

hydroxyquinoline, O-acetyl-8-hydroxyquinoline, 2,2'-bipyridine, S-acetyl-8-mercaptoquinoline, 5,7 dibromo-8-benzoil-oxyquinoldine, Arylglyoxal N-7-amino-5-substituted 8-hydroxyquinoline hemiacetals, 5-phenylglyoxylidenamin-8-hydroxyquinolines, 8-hydroxyquinoline ester, Ethyl 6,7-di-isobutoxy-4-
 5 hydroxyquinoline-3-carboxylate, Derivés halogénés de la salicylanilide, 8-hydroxyquinoline, 5-chloro-8-hydroxyquinoline (chloroxine) esters l'acide carboxylique, 2,2'-bipyridine, 8-hydroxyquinoline, 8-hydroxyquinoline et m-phenylenediamine, 1-aH-oxazirino[2,3-a]quinoline 1-a-carbonitrile et ses composés substitués des dérivés 3-hydroxyquinoline correspondants, 6,7-dimethoxy-4-
 10 hydroxyquinoline hydrochloride, 4nitroquinoline 1-oxide, 4-nitroquinoline 1-oxide, 4-aminoquinoline 1-oxide, batimastat, acides hydroxamiques, fenamates

L'invention étant décrite ici, il est évident qu'elle pourra être adaptée, développée et étendue de diverses façons. Comme il ne peut échapper aux personnes expertes en la
 15 matière, de telles variations ne peuvent être considérées comme différant de l'esprit et du champ de l'invention et de telles modifications, et elles seront incluses dans le champ d'éventuelles revendications ultérieures.

En résumé:

- 20 *- Une protéine largement répandue dans les cellules , la PrPc est un régulateur de l'activité d'une enzyme, la super-oxyde dismutase, impliquée dans la résistance cellulaire aux stress oxydatifs.
- *- La PrPc est un ligand du cuivre et du zinc.
- *- La fixation du cuivre a lieu à un niveau précis de la molécule, sur les acides aminés
 25 d'un octapeptide répété.
- *- La transformation de la protéine normale PrPc en PrPnv, protéine pathologique a lieu au niveau des octapeptides.
- *- Les ions cuivre (II) jouent un rôle dans ce processus.
- *- Enlever le cuivre doit empêcher la transformation.

*- Nous disposons d'une famille de molécules connues et déjà utilisées à d'autres usages qui séquestrent le cuivre et le zinc et qui passent facilement la barrière hémato-méningée.

- 5 *- Nous proposons l'emploi du clioquinol et de la phanquinone ou d'autres molécules chelateurs pour le traitement et la prévention des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles et de toutes maladies dues à des agents non conventionnels ou à des prions.

Revendications

- 1 L'utilisation du clioquinol et de la phanquinone pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des maladies à prions chez
5 l'homme ou l'animal et, plus généralement, des maladies provoquées par les agents transmissibles non conventionnels (ATNC).
- 2 L'utilisation conformément à la revendication 1 lorsque la maladie est influencée par l'action de maladies faisant intervenir les prions, chez l'homme les diverses formes de la maladie de Creutzfeld-Jakob, le syndrome de Gerstman-Straussler-Scheinker, le kuru et
10 chez l'animal la tremblante (scrapie) et l'encéphalopathie bovine spongiforme (ESB).
- 3 L'utilisation selon les revendications 1 ou 2 du clioquinol aux doses de 10 mg à 1 g.
- 4 L'utilisation selon les revendications 1 ou 2 de la phanquinone aux doses de 10 mg à 500 mg.
- 5 L'utilisation selon les revendications 1 ou 2 d'une combinaison de clioquinol et de
15 phanquinone aux doses de 10 mg à 1 g de clioquinol et 10 à 250 mg de phanquinone dans une seule préparation pharmaceutique.
- 6 L'utilisation selon l'une des revendications 1 à 5 de clioquinone ou de phanquinone ou leur combinaison à raison de une à quatre fois par jour.
- 7 L'utilisation selon l'une des revendications précédentes d'un sel métallique ou d'un
20 groupe prosthétique administré avant, pendant ou après l'administration de clioquinol et de phanquinone.
- 8 L'utilisation selon la revendication 7 de la vitamine B 12 comme groupe prosthétique.
- 9 L'utilisation selon l'une des revendications précédentes d'une quantité de vitamine B
25 12 suffisante pour empêcher un effet indésirable de l'administration du clioquinol et de la phanquinone.
- 10 L'utilisation selon la revendication 9 de la vitamine B 12 à la dose de 5µg à 2 mg par jour.
- 11 L'utilisation selon la revendication 9 de la vitamine B 12 à la dose de 0,5 µg à 1 mg
30 par jour.

12 L'utilisation selon l'une des revendications précédentes de la préparation pharmaceutique formulée pour l'administration par voie orale, parentérale ou intradermique.

13 L'utilisation du clioquinol et/ou de la phanquinone pour la préparation d'une
5 composition pharmaceutique destinée au traitement d'un sujet humain ou animal présentant ou pouvant présenter une condition pathologique pouvant être modifiée par l'action chélatrice sur le cuivre et/ou le zinc.

14 Utilisation du clioquinol et/ou de la phanquinone pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'un sujet humain ou animal
10 présentant ou pouvant présenter une condition pathologique pouvant relever de l'action de prions.

15 L'utilisation selon la revendication 14, consistant à administrer aux susdits sujets:

a) une quantité de clioquinol ou de phanquinone ou une combinaison de clioquinol et de phanquinone pour traiter la condition pathologique causée par les
15 prions, et

b) une quantité d'un composé ou d'un mélange de composés sélectionnés parmi le groupe comprenant des sels métalliques ou des groupes prosthétiques différents du clioquinol et de la phanquinone, possédant une autre activité vis-à-vis de la maladie à prions.

20 16 Utilisation selon les revendications 13, 14 ou 15 où la dose quotidienne de clioquinol est de 1 mg à 1 g.

17 Utilisation selon les revendications 13 14 ou 15 où la dose quotidienne de clioquinol est de 1 mg à 250 mg, administrée une à quatre fois par jour.

25 18 Utilisation selon les revendications 13, 14 ou 15 où la dose quotidienne de phanquinone est de 1 mg à 1 g.

19 Utilisation selon les revendications 13, 14 ou 15 où la dose quotidienne de phanquinone est de 1 mg à 250 mg, administrée une à quatre fois par jour.

20 Utilisation selon la revendication 15 où la quantité des composés dans (b) est 5 µg à 250 mg.

30 21 Utilisation selon la revendication 15 où le composé différent du clioquinol et de la phanquinone et possédant une autre activité est la vitamine B 12.

- 22 Utilisation selon la revendication 21 où la quantité de vitamine B 12 est de 5 µg à 2 mg.
- 23 Utilisation selon la revendication 21 où la quantité de vitamine B 12 est de 0,5 à 1 mg.
- 5 24 Utilisation selon la revendication 14 consistant à administrer aux dits sujets :
- a) une quantité de clioquinol effective pour traiter ou prévenir l'action des prions, et
 - b) un mélange de phanquinone et de vitamine B 12 comprenant une quantité de phanquinone suffisante pour empêcher l'action des prions et une quantité de vitamine B
- 10 12 suffisante pour empêcher les effets indésirables de l'administration du clioquinol.
- 25 Utilisation selon les revendications 15 ou 24 où a) le clioquinol et b) le(s) composé(s) sont présents dans une seule préparation pharmaceutique.
- 26 Utilisation selon les revendications 15 ou 24 où a) le clioquinol et b) le(s) composé(s) sont administrés simultanément.
- 15 27 Utilisation selon les revendications 15 ou 24 où a) le clioquinol et b) le(s) composé(s) sont administrés séquentiellement.
- 28 Utilisation selon les revendications 15 ou 24 où a) le clioquinol et b) la vitamine B 12 sont administrés séquentiellement.
- 29 Utilisation selon les revendications 15 ou 24 où a) la phanquinone et b) la vitamine
- 20 B 12 sont administrés séquentiellement.
- 30 Utilisation selon les revendications 15 ou 24 où la phanquinone est administrée dans un premier temps suivi par l'administration du clioquinol dans un second temps.
- 31 Utilisation selon les revendications 15 ou 24 où le clioquinol est administré dans un premier temps suivi par l'administration de la phanquinone dans un second temps.
- 25 32 Utilisation selon les revendications 30 et 31 où la première période est de une à trois semaines et la seconde de une à quatre semaines.
- 33 Utilisation selon les revendications 13 et 15 où le clioquinol est formulé pour l'administration orale.
- 34 Utilisation selon les revendications 13 et 15 où le clioquinol est formulé pour
- 30 l'administration parentérale.

35 Utilisation selon les revendications 13 et 15 où la phanquinone est formulée pour l'administration orale.

36 Utilisation selon les revendications 13 et 15 où la phanquinone est formulée pour l'administration parentérale.

5 37 Utilisation selon les revendications 13 et 15 où la combinaison du clioquinol et de la phanquinone est formulée pour l'administration orale.

38 Utilisation selon les revendications 13, et 15 où la combinaison du clioquinol et de la phanquinone est formulée pour l'administration parentérale.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.